

DENEYSSEL İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE GEÇ TROMBOLİTİK TEDAVİ ÖNCESİ MAGNEZYUM SÜLFATIN ETKİNLİĞİ

THE EFFICACY OF MAGNESIUM SULFATE BEFORE DELAYED THROMBOLYTIC TREATMENT IN EXPERIMENTAL MODEL OF ISCHEMIA REPERFUSION

Fettah EREN¹, Şerefnur ÖZTÜRK², Ali ÜNAL³, Hülagu BARIŞKANER⁴, Ceylan UĞURLUOĞLU⁵

¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği,

²Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı,

³Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı,

⁴Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı,

⁵Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

ÖZ

AMAÇ: İskemik inmenin primer tedavisi oklüde vasküler yapıların rekanalizasyonudur. Bunun için kullanılan medikal tedavi doku plazminojen aktivatörü (tPA)'dır. Endikasyon süresi ilk 4,5 saat ile sınırlı olduğundan, hastaların büyük kısmı bu intravenöz tedaviye ulaşamamaktadır. Bu yüzden geç trombolitik tedavi öncesi magnezyum sülfat (MgSO₄)'ın etkinliğinin değerlendirildiği deneysel bir çalışma planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: 52 sıçan rastgele altı gruba ayrıldı. 1. grup, kontrol grubuydu ve herhangi bir işlem yapılmadı. 2. grup, sham grubuydu ve paratrakeal kas diseksiyonu ile karotis artere ulaşıldı. 3. grupta, karotis arter oklüde edildi ve 345 dakika sonra tPA başlandı. 4. grupta, 345 dakika sonra tPA ve 120 dakika sonra MgSO₄ başlandı. 5. grupta, 300 dakika sonra MgSO₄ ve 345 dakika sonra tPA başlandı. 6. grupta, 120 ve 300 dakika sonra MgSO₄ başlandı; 345 dakika sonra ise tPA başlandı. Tüm gruplarda 360 dakika sonra reperfüzyon sağlandı. 24 saat sonra tüm sıçanların nörolojik muayeneleri yapıldı. Kan ve beyin dokusu örnekleri alındı. Kandan nöron spesifik enolaz (NSE) ve iskemik modifiye albümin (IMA) çalışıldı. Beyin dokusu Hematoksilen Eozin ve krezil vijyole ile boyandı. Dejenere piramidal nöronlar değerlendirildi.

BULGULAR: Grup 3'de mortalite oranı %40, grup 4'de %22.2, grup 5'de %30 ve grup 6'da %11.11 idi. Grup 4'te %17.8, grup 5'te %10 ve grup 6'da %28.9 oranında mortalitede azalma vardı. Grup 6'nın fonksiyonel dizabilitesi ve dejenere nöronal yüzdesi en azdı (p=0.04; p=0.005). NSE seviyesi düşüklüğü fonksiyonel iyilik durumu ve tedavi etkinliği ile ilişkiliydi (r=0.54; p=0.005). IMA seviyesi arttıkça fonksiyonel dizabilite artmaktaydı (p=0.003; r=0.47). Ancak MgSO₄ verilen gruplar arasında IMA seviyelerinde farklılık yoktu (p=0.06).

SONUÇ: Geç trombolitik tedavi öncesi, MgSO₄'ın erken başlanması ve doz tekrarı ile daha iyi fonksiyonel ve histopatolojik sonuçlar elde edilmektedir. NSE ise tedavi etkinliği ve özüllülük durumu ile ilişkili bir biyobelirteçtir.

ANAHTAR KELİMELER: Reperfüzyon hasarı, İntravenöz tromboliz, Magnezyum sülfat

ABSTRACT

OBJECTIVE: The primary treatment of ischemic stroke is recanalization of occluded vascular structure. The treatment for that is tissue plasminogen activator (tPA). Since the indication period is limited to the first 4.5 hours, the majority of patients can not reach this intravenous treatment. Therefore an experimental study was planned to evaluate the efficacy of magnesium sulfate (MgSO₄) before delayed thrombolytic therapy.

MATERIAL AND METHODS: 52 rats were randomly divided to six groups. Group 1 was the control group and no operation was performed. Group 2 was sham group and paratracheal muscles were dissected and carotid artery was reached. In group 3, carotid artery was occluded and tPA was started after 345 minutes. In group 4, tPA was started after 345 minutes and MgSO₄ was started after 120 minutes. In group 5, MgSO₄ was started after 300 minutes and tPA was started after 345 minutes. In group 6, MgSO₄ was started after 120 and 300 minutes; After 345 minutes, tPA was started. All groups were reperfused after 360 minutes. After 24 hours, neurological examinations of all rats were performed. Blood and brain tissue specimens were taken. Neuron specific enolase (NSE) and ischemia modified albumin (IMA) were analyzed from blood. Brain tissue was stained with Hematoxylin Eosin and cresyl violet. Degenerated pyramidal neurons were evaluated.

RESULTS: The mortality rate was 40% in group 3, 22.2% in group 4, 30% in group 5 and 11.11% in group 6. Mortality reduction was detected 17.8% for group 4, 10% for group 5 and 28.9% for group 6. Functional disability and percentage of degenerated neurons was the least in group 6 (p=0.04). Decreased NSE level was associated with functional improvement and treatment efficacy (p=0.005; r=0.54). Functional disability correlated with increasing of IMA level (p=0.003; r=0.47). But there was no difference in IMA levels among MgSO₄-treated groups (p=0.06).

CONCLUSIONS: Early onset and repetitive dose MgSO₄ have the best functional and histopathologic results in delayed thrombolytic treatment. NSE is a biomarker that is associated with treatment efficacy and disability.

KEYWORDS: Reperfusion injury, Intravenous thrombolysis, Magnesium sulfate

Geliş Tarihi / Received: 24.12.2018

Kabul Tarihi / Accepted: 06.03.2019

Yazışma Adresi / Correspondence: Uzm.Dr.Fettah EREN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Nöroloji Kliniği
dreren42@hotmail.com

Orcid No:0000-0001-6834-0827

GİRİŞ

Serebral kan akım hızı, 100 mg beyin dokusu için 10ml/dk'nın altına düşerse saniyeler içerisinde nöronal doku kaybı başlar ve iskemik bir alan oluşur. Bu alanın etrafında 10-20 ml/dk kan akım hızına sahip olan penumbra bulunmaktadır. Reperfüzyonun asıl amacı penumbranın kurtarılmasıdır. Bu amaçla doku plazminojen aktivatörü (tPA) olan alteplaz kullanılmaktadır (1). Bu tedavi ile hastaların %30'uda minimal morbidite ve hastalığın 3. ayında tam iyileşme sağlanabilmektedir (2). İntravenöz (IV) trombolitik tedavi başlangıçta ilk 3 saat içerisinde kullanım onayı almış ancak uygun hastalarda 3-4,5 saat içerisinde de kullanılabilceği gösterilmiştir (3). İntraarterial (IA) ve IV tedaviler ile reperfüzyon sağlanmasının en korkulan komplikasyonu ise nöronal hasarın ve hemorajik transformasyonun artabilmesidir (4). Reperfüzyon hasarını azaltmak, trombolitik tedavinin daha sık ve etkili kullanımı için önemlidir.

Magnezyum hücre içinde ikinci, tüm vücutta dördüncü sıklıkta bulunan katyondur. N-metil D-aspartat (NMDA) reseptör ve voltaj bağımlı kalsiyum kanal blokajı ile eksitator nörotransmitter salınımını azalmaktadır. Ayrıca mitokondriyal disfonksiyonu ve antiinflamatuvar etkinliği ile lipid peroksidasyonunu engellemektedir. Böylece nöronal dokunun reaktif oksijen radikallerine karşı dayanıklılığını artırmaktadır (5). Magnezyum tuzları içerisinde en etkili ise magnezyum sülfat ($MgSO_4$)'tır (6).

Nörolojik hastalıkların erken dönemde tanınması, tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi ve prognoz tayininde biyobelirteçler kullanılabilir. Bu amaçla çalışılmış çok sayıda biyobelirteç bulunmaktadır. Nöron spesifik enolaz (NSE) ve iskemi modifiye albümin (IMA) iskemik inmede nöronal hasarla ilişkili biyobelirteçlerden bazılarıdır (7).

Endikasyon süresi dışında tPA tedavisi uygulanması ciddi komplikasyonlar meydana getirebilmektedir. Bu da ilacın kullanımını önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Bu yüzden son yıllarda serebral reperfüzyon hasarını engelleyecek ve tPA'nın kullanım süresini genişletecek kombine tedaviler aranmaktadır. Bu nedenle tPA ile eş zamanlı geç reperfüzyonun sağlandığı ve öncesinde

$MgSO_4$ kullanımının etkilerinin değerlendirildiği deneysel bir çalışma planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma hayvanları Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Laboratuvar hayvanları bakım ve kullanım ilkeleri kılavuzuna (www.nap.edu/catalog/5140.html) bağlı kalınarak çalışma yürütüldü. Çalışmada 52 adet, 394-698 gram (gr) ağırlığında, wistar albino cinsi, 11-13 aylık erkek sıçan kullanıldı. Sınırsız yiyecek ve su ile birlikte gece gündüz döngüsünün sağlanabilmesi için 24 saat hiçbir işlem yapılmaksızın laboratuvar da bekletildi. Oda sıcaklığı 24-28 °C arasında tutuldu.

Çalışmanın cerrahi prosedürü için vasküler oklüzyon tekniği kullanıldı. Oklüzyon için klemp tercih edildi (8). İntraperitoneal (IP) 50 miligram/kilogram (mg/kg) ketamin ve 4 mg/kg xylazine ile genel anestezi ve sedasyon analjezi sağlandı. Anestezinin etkinliği değerlendirmek için 15 dakikada bir sıçanın kuyruğuna ağırlı uyaran verildi. Reaksiyon verenlere IP 4 mg/kg ketamin ve xylazine tekrarlandı. Boyun bölgesi temizlendi ve lokal antisepsi uygulandı. Paratrakeal kas diseksiyonu ile sol ana karotis artere ulaşıldı. Karotis arter bifurkasyonun 2 santimetre (cm) proksimali A6-236 diffrenbach bulldog klemp ile oklüde edildi. Sağ juguler vene katater yerleştirilerek IV ilaç infüzyonu için hazırlandı. Bu işlemler sırasında rektal termometre ile vücut sıcaklığı 37 °C olacak şekilde takip edildi.

Tüm sıçanlar rastgele 6 gruba ayrıldı. 1. grupta (kontrol grubu, sayı=6) cerrahi işlem yapılmadı. 2. grupta (sham grubu, sayı=6) servikal insizyon yapıldıktan sonra paratrakeal kaslar diseke edilerek karotis artere ulaşıldı ancak oklüde edilmedi. 3. grupta (geç trombolitik tedavi grubu, sayı=10) vasküler oklüzyonun 6. saatinde klemp açıldı. Oklüzyon açılmadan 15 dakika önce tPA başlandı. 4. grupta (geç trombolitik tedavi+erken $MgSO_4$ tedavi grubu, sayı=10) oklüzyonun 6. saatinde klemp açıldı. Oklüzyon açılmadan 15 dakika önce tPA, 4 saat önce $MgSO_4$ başlandı. 5. grupta (geç trombolitik tedavi+geç $MgSO_4$ tedavi grubu, sayı=10) oklüzyonun 6. saatinde klemp açıldı. Oklüzyon açılmadan 15 dakika önce tPA, 2 saat önce $MgSO_4$ başlandı. 6.

grupta ise (geç trombolitik tedavi+erken ve geç MgSO₄ tedavi grubu, sayı=10) oklüzyonun 6. saatinde klemp açıldı. Oklüzyon açılmadan 15 dakika önce tPA, 2 ve 4 saat önce MgSO₄ başlandı. İşlem sonrası cerrahi bölge suture ile kapatıldı ve lokal pansuman yapıldı. Sıçanlar uyandıktan sonra kafeslerine alındı.

Juguler vene konulan kataterin tromboze olmaması için 50 IU heparin uygulandı. İskemik inmede insanda kullanılan tPA dozu 0,9 mg/kg iken, bu çalışmada 10 mg/kg kullanıldı. Çünkü insan fibrinolitik sistemi trombolitik tedaviye, sıçanlara göre 10 kat daha duyarlıdır. Hesaplanan total tPA dozunun %10'u bolus, kalanı 30 dakikada IV infüzyon şeklinde verildi (9). Toplam MgSO₄ (90 mg/kg) dozu ise 15 dakikada IV infüzyon şeklinde uygulandı (10).

Yaşayan sıçanlara 24 saat sonra genel değerlendirme ve nörolojik muayene yapıldı. Nörolojik defisit öncelikle nörolojik muayene sınıflandırma sistemi (NMSS) ölçeği ile değerlendirildi. Sıçanlar kuyruğundan tutulup yukarı kaldırıldı. Sonra düz bir zeminde yürütüldü. Bu şekilde ön ve arka ayak motor kuvvetleri değerlendirildi. 0 dizabilite olmamasını, 1 hafif, 2 ve 3 ağır dizabiliteyi gösterdi (11). İkinci olarak modifiye nörolojik hasar ciddiyeti belirleme (MNHCB) ölçeği uygulandı. Bu test ile denge, koordinasyon, refleksler, anormal hareketler, kas gücü ve duyu değerlendirildi. 1-6 hafif, 7-12 orta ve 13-18 ağır nörolojik dizabiliteyi gösterdi (12).

Muayene işlemi sonrası genel anestezi altında intrakardiyak kan örnekleri alındı. Alınan kanlar 1500 devir sayısı/dakika (rpm) ile 10 dakika santrifüj edilerek -80 °C'de saklandı. NSE değerlendirilmesi için (Elabscience)R marka sadece çalışmalar için kullanılan enzim linked immunoabsorbent eliza kitler kullanıldı. ClariosSTAR ELISA mikroplate okuma cihazında 450nm'de okutularak veriler kaydedildi. MARS Data Analysis Software kullanılarak sonuçlar değerlendirildi. İMA ölçümü için ependorflara 200 mikrolitre (µl) sıçan serumu ve 50 µl kobalt klorid (1 g/l'lik) konuldu. Karışım 10 saniye kadar vortekslenerek homojen hale getirildi. Kobalt-albümin bağlanması için karışım 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Albümine bağlanmayan kobaltı belirlemek için ölçüm küvetine 50 µl 1.5 g/l'lik ditiyotreitöl (DTT) eklenerek karıştırıldı ve bu

şekilde ditiyotreitölün, albümine bağlanmamış kobalt ile renkli kompleks oluşturması sağlandı. 2 dakika sonra reaksiyonu durdurmak için 1 ml serum fizyolojik eklendi. Oluşan siyah renkli kompleks 470 nanometre (nm) dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

Beyin orta hattın, her iki hemisferi de içerecek ve aynı anatomik bölgeye denk gelecek şekilde 5 mikrometre (µm) kalınlığında mikrotomal kesitler alındı. Hematoksilen Eozin (H&E) ve krezil viyole boyası ile boyandı. Bu preparatlarda 400'lük büyütme ile Analysis 5 Research programı kullanılarak dejenere piramidal nöronlar sayıldı. Piramidal nöronlardaki; koyu renkli ve küçülmüş nükleuslar, nissl kaybı ve eozinofili dejenerasyon belirtisi kabul edildi. Dejenere nöronların yüzdelik oranları belirlendi (13).

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin analizi için istatistik paket programı (SPSS) 21.0 kullanıldı. Sayı, yüzde, ortalama±standart sapma değerleri için tanımlayıcı testler, grupların karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığının tespiti için Bonferoni düzeltmesi ile Mann Whitney U testi kullanıldı. Numerik dışı veri karşılaştırılmasında Ki-kare testi, sonuçların kendi arasında değerlendirilmesi için Spearman's korelasyon testi kullanıldı. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirildi. p<0.05 istatistik anlamlılık kabul edildi. r değeri 0-0.25 arasında korelasyon yok; 0.25-0.50 arasında zayıf; 0.50-0.75 arasında güçlü; 0.75-1.00 çok güçlü korelasyon olarak yorumlandı.

ETİK KURUL ONAYI

Çalışma için Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden hayvan deneyleri etik kurul onayı alındı (Karar sayısı: 2016-14).

BULGULAR

Çalışmada 52 adet erkek sıçan vardı. Yaş ortalamaları 12.11±0.67 aydı. Ağırlıkları 493.96±65.19 gr idi. 4. ve 6. gruplardan birer sıçan teknik komplikasyonlar nedeni ile çalışma dışı bırakıldı. İşlemin 24. saatinde grup 1'de 6, grup 2'de 6, grup 3'de 6, grup 4'de 7, grup 5'de 7 ve grup 6'da 8 sıçan hayatta kaldı Tablo 1. Grup 3'de mortalite oranı %40, grup 4'de %22.2, grup 5'de

%30 ve grup 6'da %11.11 idi. MgSO₄ erken verilen 4. grupta %17.8, geç verilen 5. grupta %10, hem erken hem geç verilen 6. grupta ise %28.9 oranında mortalitede azalma saptandı.

Fonksiyonel durumunu değerlendirmek için uygulanan NMSS sonucunda, kontrol grubu normaldi (Grade 0). Sham grubunda 2 sıçanda grade 1 defisit vardı. Bu gruptaki diğer sıçanlar normaldi. 3. gruptan 4 sıçanda grade 2, 2 sıçanda grade 3 defisit vardı. 4. gruptaki sıçanların 1'inde grade 1, 4'ünde grade 2, 2'sinde grade 3 defisit vardı. 5. gruptaki sıçanların 5'inde grade 2, 2'sinde grade 3 defisit vardı. 6. gruptaki sıçanların 2'sinde grade 1, 5'inde grade 2, 1'inde grade 3 defisit vardı (**Tablo 1**).

Tablo 1: Gruplardaki denek ve eksitus sayıları ile 24. saat nörolojik dizabilite derecelerine göre sıçan sayıları

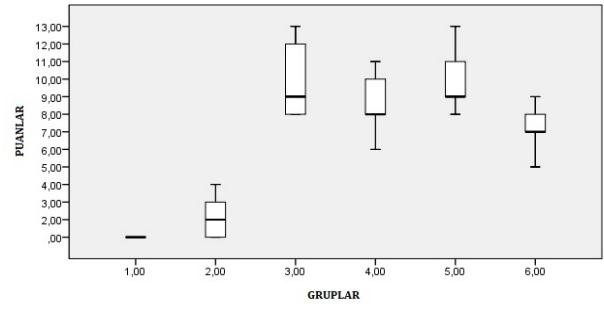
	Sayılar	Eksitus	Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3
Grup 1	6	0	6	0	0	0
Grup 2	6	0	4	2	0	0
Grup 3	10	4	0	0	4	2
Grup 4	9	2	0	1	4	2
Grup 5	10	3	0	0	5	2
Grup 6	9	1	0	2	5	1

Gruplar arasında istatistiki anlamlı farklılık bulunmasa da erken magnezyum verilen grup 4 ile erken ve geç magnezyum verilen grup 6'da majör dizabilite oranları daha azdı ($p=0.34$) (**Şekil 1**).



Şekil 1: Nörolojik muayene değerlendirme sistemi skalasına göre grupların fonksiyonel özürüllük durumları

MNHCB ölçeği sonuçları kontrol grubunda normaldi. Sham grubu bu ölçekten ortalama 1.83 ± 1.46 puana sahipti. 3. grupta 9.86 ± 1.81 ; 4. grupta 8.67 ± 1.60 ; 5. grupta 9.71 ± 1.83 ve 6. grupta 7.00 ± 1.12 puan ortalaması vardı (**Şekil 2**). Geç trombolitik verilen gruplar ikişerli karşılaştırıldığında 6. grupta belirgin dizabilite azalması saptandı ($p=0.04$).



Şekil 2: Modifiye nörolojik hasar ciddiyeti belirleme ölçeğine göre ortalama puanların gruplara göre dağılımı

NSE (ng/mL) kan düzeyi ortalaması, kontrol grubunda 2.79 ± 1.53 ve sham grubunda 3.68 ± 0.87 idi. Grup 3'te 7.32 ± 1.61 ; grup 4'te 3.92 ± 0.94 ; grup 5'te 6.97 ± 1.69 ve grup 6'da 4.82 ± 1.64 idi Tablo 2. NSE kan seviyesi, vasküler oklüzyon yapılan tüm gruplarda yüksekti ($p=0.001$). 3. grupta ise diğer gruplara göre daha yüksekti ($p=0.005$). NSE seviyesi MNHCB ölçeğindeki dizabilite ile ilişkiliydi ($p<0.001$; $r=0.54$).

IMA (g/dL) kan seviyesi ortalaması kontrol grubunda 0.67 ± 0.51 ve sham grubunda 0.89 ± 0.69 idi. Grup 3'te 1.58 ± 0.51 ; grup 4'te 1.62 ± 0.46 ; grup 5'te 1.46 ± 0.69 ve grup 6'da 2.35 ± 0.79 idi (**Tablo 2**).

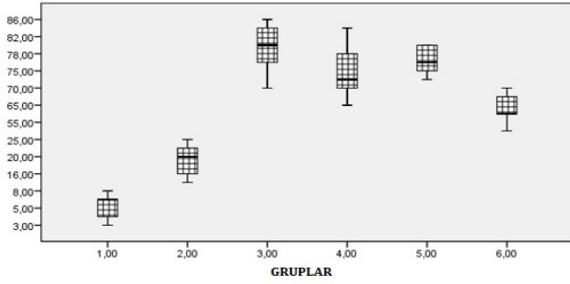
Tablo 2: Grupların nöron spesifik enolaz ve iskemi modifiye albümin düzeyleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6
NSE (Mean±SD)	2,79±1,53	3,68±0,87	7,32±1,61	3,92±0,94	6,97±1,69	4,82±1,64
IMA (Mean±SD)	0,67±0,51	0,89±0,69	1,58±0,51	1,62±0,46	1,46±0,69	2,35±0,79

Mean: Ortalama, SD: Standart sapma, NSE: Nöron spesifik enolaz, IMA: Iskemi modifiye albümin

Gruplar ikişerli karşılaştırıldığında 3. gruba göre MgSO₄ verilen 4, 5 ve 6. gruplar arasında belirgin farklılık yoktu ($p=0.06$). Ancak kontrol ve sham grubuna göre tüm gruplarda IMA kan seviyesi yüksekti ($p=0.02$). IMA seviyesi arttıkça MNHCB ölçeğinde fonksiyonel dizabilite de artmaktaydı ($p=0.003$; $r=0.47$).

Dejenere nöronal yüzdeler, kontrol grubunda 5.33 ± 1.75 ; sham grubunda 18.83 ± 5.52 ; grup 3'te 79.50 ± 6.05 ; grup 4'te 73.85 ± 6.76 ; grup 5'te 76.57 ± 2.93 ve grup 6'da 60.75 ± 6.34 idi (**Şekil 3**). MgSO₄ verilen gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiki anlamlı farklılık izlenmedi ($p=0.06$). Ancak 6. gruptaki doku örneklerinde 3. gruba göre dejenerasyonda belirgin azalma vardı ($p=0.005$).



Şekil 3: Dejenere nöronların ortalama yüzdelilerinin gruplara göre dağılımı

TARTIŞMA

Magnezyum vasküler yapılar üzerinden farklı mekanizmalar ile nöronal dokuları etkilemektedir. Yapılan çalışmalar, MgSO₄'ün 10-40 mg/kg/saat hızında, IV uygulanmasının nöroprotektif etkisi olduğunu göstermiştir (14). Ayrıca intrasisternal uygulanan MgSO₄'ün da hipokampüste nöroprotektif etkisi olduğu ve iskemik alanı azalttığı ortaya konulmuştur (15). Bu çalışmalar MgSO₄'ün IV infüzyon veya intraserebral olarak verilmesinin etkili olduğunu göstermiştir.

Magnezyumun etkinliği, öncelikle kısa süreli iskemi-reperfüzyon modellerinde değerlendirilmiştir. Etkin doz, kombine kullanım ve uzun süreli vasküler oklüzyondaki etkisi için de çalışmalar yapılmıştır. 1 saat serebral vasküler oklüzyon oluşturulan sıçanlara, iskemiden 30 dakika önce 90 mg/kg dozunda MgSO₄ verilmiştir. 24 saat sonra iskemik hacminde ve fonksiyonel dizabilitede azalma olduğu görülmüştür (16). Oklüzyondan sonra 45 mg/kg dozunda MgSO₄'ün ve reperfüzyondan önce 6 mg/kg dozunda nimesulid'in sinerjistik etki ile iskemi alanını azalttığı saptanmıştır (17). Bu nedenle çalışmamızda etkinliği kanıtlanmış olan 90 mg/kg MgSO₄ dozu kullanıldı. MgSO₄'ün erken (2. saat), nispeten daha geç (5. saat) ve hem erken hem de geç (2. ve 5. saat) verilmesinin etkileri değerlendirildi. MgSO₄ tedavisine erken başlamanın ve doz tekrarının daha iyi klinik ve histopatolojik sonuçlar ortaya çıkardığı görüldü.

Klinik çalışmalara bakıldığında, 12 saat içinde akut iskemik inme geçiren 2589 hastaya 16 mmol magnezyum 15 dakikada verilmiştir. 24 saat boyunca IV infüzyona devam edilmiştir. Bu çalışmada magnezyumun sadece laküner infarktı olan hasta gurubunda faydalı olduğu

gösterilmiştir (18). Benzer bir çalışmada 12 saat içinde iskemik inme geçiren hastalara başvuruda 4 g (15 dakikada), sonra 16 g MgSO₄ (24 saatte) IV infüzyon şeklinde verilmiştir. Sonuçta MgSO₄'ün nöroprotektif etkinliği olduğu ve iskemik inmede etkili olduğu ortaya konulmuştur (19). Ancak tüm bu sonuçlar magnezyumun rutin klinik kullanımı için yeterli bulunmamıştır.

Akut iskemik inmede ilk 4,5 saat dışında trombolitik tedavi başlanması reperfüzyona bağlı nöronal hasarı artırmaktadır. Bu da ilacın kullanımını önemli ölçüde sınırlamaktadır (4). Bu sürenin uzatılmasını sağlamak için çeşitli deneysel tedaviler uygulanmıştır. Ancak literatürde bu konuda MgSO₄ ile yapılan çalışma bulunmamıştır. Matriks metalloproteinaz (MMP) inhibitörü BB-94'ün mortaliteyi %33 oranında azalttığı saptanmıştır (20). Salidrozinin kan beyin bariyerinin bütünlüğünü koruyarak, geç tPA öncesi reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir (21).

Bu tedaviler özellikle nitrik oksit üzerinden, MMP inhibisyonu sağlamaktadır ve geç trombolize bağlı nöronal hasarı azaltmaktadır(22). Ayrıca antiinflamatuvar mekanizmalar da bu sürece olumlu katkı sağlamaktadır (23). Bizim çalışmamızda ise geç trombolitik tedavi öncesi MgSO₄'ün erken verilmesi %17,8, geç verilmesi %10, erken başlanıp tekrarlanan dozlarda verilmesi %28,9 oranında mortalitede azalma sağladı. MgSO₄'i erken başlamanın ve doz tekrarının mortalite, özürülülük ve nöronal dejenerasyon üzerine olumlu etkileri olduğu ortaya konuldu. Son 20 yıl içerisinde serebral hastalıkların tanısı daha kolay konulabilmektedir. Ancak ulaşımı daha kolay, duyarlı ve özgül biyobelirteç arayışı devam etmektedir. Bunlardan NSE, nöronların ve nöroendokrin hücrelerin sitoplazmasında bulunmaktadır. İnmede kan beyin bariyeri bozulması ile kanda yükselmeye başlamaktadır. İskemik inmede tPA tedavisi alan hastaların 24. saatteki kan NSE seviyesi düşüklüğü daha az nörolojik kötüleşme ve 90. günde daha az nörolojik dizabilite ile ilişkili bulunmuştur (24). Bizim çalışmamızda da fonksiyonel özürülülüğün, NSE kan seviyesi ile ilişkili olduğu görüldü. İMA ise, albuminin N terminal ucunun serbest oksijen radikalleri ile değişikliğe uğraması sonucu oluşmaktadır. İskemik inmede, İMA kan seviyesinin yükseldiği bilinmektedir (25). Bizim çalışmamız-

da da IMA kan seviyesi iskemi oluşturulan tüm gruplarda yükseldi, ancak bu seviyenin fonksiyonel dizabilite ile korelasyonu zayıftı.

Sonuç olarak; tPA'nın endikasyon süresi kısıtlılığı, akut iskemik inmedeki kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle bu tedaviyi daha uzun sürede, etkili ve güvenli uygulamanın yolları aranmaktadır. MgSO₄ bu amaçla kullanılabilir tedavilerden biridir. Erken başlanması ve doz tekrarı ile geç trombolitik tedavide daha iyi sonuçlar sağlanmaktadır. Özellikle NSE, fonksiyonel dizabilite ile ilişkilidir.

Çalışmanın kısıtlılıkları; iskemi reperfüzyon modeli, klinik iskemik inme ile birebir eşdeğer değildir. Ancak tPA ilişkili geç reperfüzyon hasarını değerlendirmek için objektif bir yöntemdir. Tüm sıçanlar 24 saat sonra sakrifiye edildiğinden uzun dönem sonuçlar bilinmemektedir. Daha uzun süre MgSO₄ infüzyonunun etkileri değerlendirilememiştir.

KAYNAKLAR

1. Furlan AJ, Eyding D, Albers GW, et al. Dose escalation of desmoteplase for acute ischemic stroke (DEDAS): evidence of safety and efficacy 3 to 9 hours after stroke onset. *Stroke* 2006;37:1227-31.
2. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. *JAMA* 1995;274:1017-59.
3. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008;359:1317-29.
4. Kanazawa M, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. Therapeutic strategies to attenuate hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator treatment for acute ischemic stroke. *J Atheroscler Thromb* 2017;24:240-53.
5. Vink R. Magnesium in the CNS: recent advances and developments. *Magnes Res* 2016;29:95-101.
6. Chollat C, Marret S. Magnesium sulfate and fetal neuroprotection: overview of clinical evidence. *Neural Regen Res* 2018;13:2044-49.
7. Glushakova OY, Glushakov AV, Miller ER, Valadka AB, Hayes RL. Biomarkers for acute diagnosis and management of stroke in neurointensive care units. *Brain Circ* 2016;2:28-47.
8. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84-91.
9. Kim EJ, Kim SY, Lee JH, et al. Effect of isoflurane post-treatment on tPA-exaggerated brain injury in a rat ischemic stroke model. *Korean J Anesthesiol* 2015;68:281-6.
10. Campbell K, Meloni BP, Knuckey NW. Combined magnesium and mild hypothermia (35 degrees C) treatment reduces infarct volumes after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat at 2 and 4, but not 6 h. *Brain Res* 2008;1230:258-64.
11. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986;17:472-76.
12. Chen J, Li Y, Wang L, et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001;32:1005-11.
13. Garman RH. Histology of the central nervous system. *Toxicol Pathol* 2011;39:22-35.
14. Lingam I, Robertson NJ. Magnesium as a neuroprotective agent: A review of its use in the fetus, term infant with neonatal encephalopathy, and the adult stroke patient. *Dev Neurosci* 2018;40:1-12.
15. Mori K, Yamamoto T, Nakao Y, et al. Novel neuroprotective effect of cisternal and intracerebral magnesium sulfate solution infusion on delayed cerebral death in rat hippocampal neurons after transient global ischemia. *Brain Res* 2012;1480:72-80.
16. Lin JY, Chung SY, Lin MC, Cheng FC. Effects of magnesium sulphate on energy metabolites and glutamate in the cortex during focal cerebral ischemia and reperfusion in the gerbil monitored by a dual-probe microdialysis technique. *Life Sci* 2002;71:803-11.
17. Wang LC, Huang CY, Wang HK, Wu MH, Tsai KJ. Magnesium sulfate and nimesulide have synergistic effects on rescuing brain damage after transient focal ischemia. *J Neurotrauma* 2012;29:1518-29.
18. Intravenous Magnesium Efficacy in Stroke (IMAGES) Study Investigators. Magnesium for acute stroke (Intravenous magnesium efficacy in stroke trial): randomised controlled trial. *Lancet* 2004;363:439-45.
19. Afshari D, Moradian N, Rezaei M. Evaluation of the intravenous magnesium sulfate effect in clinical improvement of patients with acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2013;115:400-4.
20. Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPa-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 2003;34:2025-30.
21. Zuo W, Yan F, Zhang B, Hu X, Mei D. Salidroside improves brain ischemic injury by activating PI3K/Akt pathway and reduces complications induced by delayed tPA treatment. *Eur J Pharmacol* 2018;830:128-38.

22. Chen H, Chen X, Luo Y, Shen J. Potential molecular targets of peroxynitrite in mediating blood–brain barrier damage and haemorrhagic transformation in acute ischaemic stroke with delayed tissue plasminogen activator treatment. *Free Radic Res* 2018;52:1220-39.

23. Mizuma A, Yenari MA. Anti-inflammatory targets for the treatment of reperfusion injury in stroke. *Front Neurol* 2017;8:467.

24. Lu K, Xu X, Cui S, Wang F, Zhang B, Zhao Y. Serum neuron specific enolase level as a predictor of prognosis in acute ischemic stroke patients after intravenous thrombolysis. *J Neurol Sci* 2015;359:202-6.

25. Jena I, Nayak SR, Behera S, et al. Evaluation of ischemia-modified albumin, oxidative stress, and antioxidant status in acute ischemic stroke patients. *J Nat Sci Bio Med* 2017;8:110-13.